

مقاله پژوهشی

اثرات ضدباکتریایی پلی‌پپتید EC-hepcidin1 در مهار باکتری *Streptococcus iniae* در کشت‌های سلولی اولیه قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

زهرة قدسی^۱، محمد رضا کلباسی^{۲*}، اشرف محبتی مبارز^۳، پروانه فرزانه^۴

تاریخ دریافت: دی ۹۷

تاریخ پذیرش: خرداد ۹۸

چکیده

استرپتوکوکوزیس یکی از مخرب‌ترین بیماری‌ها در آبی‌پروری جهانی است و تاکنون تلاش‌های زیادی در راستای مهار این باکتری صورت پذیرفته است. در این پژوهش توانایی پلی‌پپتید ضد میکروبی مصنوعی هپسیدین (EC-hepcidin1) در مهار باکتری *Streptococcus iniae* (عامل بیماری استرپتوکوکوزیس در آبزیان) در کشت سلولی اولیه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) مورد ارزیابی قرار گرفت. ابتدا با دیسک دیفوزیون اثرات ضدباکتریایی این پلی‌پپتید مورد بررسی قرار گرفت. حداقل غلظت ممانعت از رشد و حداقل غلظت کشندگی EC-hepcidin1 در برابر *S. iniae* اندازه‌گیری شد. سپس کشت سلولی اولیه از باله ماهی تولید و محدوده سمیت این پلی‌پپتید برای سلول‌ها مشخص شد. کشت‌های سلولی اولیه ماهی با باکتری آلوده شد و در شرایط آزمایشگاهی فعالیت ضدباکتریایی پلی‌پپتید و میزان زنده‌مانی سلول‌ها در کشت سلولی، مورد سنجش قرار گرفت. نتایج به دست آمده از این مطالعه، حداقل غلظت ممانعت از رشد و حداقل غلظت کشندگی پپتید به ترتیب بیش از ۷۵ و کمتر از ۱۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر محاسبه شد. میزان سمیت پلی‌پپتید هپسیدین پس از ۴۸ ساعت و در محدوده ۲۵ تا ۴۰۰ میکروگرم در لیتر سمیت کمی را نشان داد و سلول‌ها ۶۰ تا ۸۰ درصد زنده‌مانی داشتند. میزان زنده‌مانی سلول‌ها بعد از تلقیح باکتری با تراکم ۱۰:۱ MOI در سلول‌های ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان ۵۵ درصد بود که بعد از تلقیح باکتری با تراکم ۱۰:۱ MOI به همراه ۱۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر پلی‌پپتید، میزان زنده‌مانی سلول‌ها به ۹۰ درصد افزایش یافت. در مجموع، پلی‌پپتید EC-hepcidin1 اثرات ضدباکتریایی مناسبی علیه *S. iniae* در شرایط آزمایشگاهی داشت و در عین حال به دلیل سمیت کم در سلول‌های ماهی، قادر است میزان زنده‌مانی سلول‌های آلوده شده با این باکتری را افزایش داد.

واژگان کلیدی: سلول اولیه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان، پلی‌پپتید، ضدباکتریایی، EC-hepcidin1 *Streptococcus iniae*

- ۱- دانشجوی دکتری شیلات، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران.
- ۲- استاد گروه شیلات، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران.
- ۳- استاد گروه میکروبیشناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.
- ۴- استادیار مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران، تهران، ایران.

* نویسنده مسئول: kalbassi_m@modares.ac.ir

مقدمه

اسید آمینه) با وزن مولکولی کم (از ۱ تا ۵ کیلودالتون) و عمدتاً کاتیونی هستند (Broghden et al., 2003) و طیف گسترده‌ای از فعالیت‌های ضد میکروبی را در برابر انواع عوامل بیماری‌زا مانند قارچ‌ها، باکتری‌ها و ویروس‌ها نشان می‌دهند و قادر هستند این عوامل بیماری‌زا را به سرعت و در عرض چند دقیقه مهار کنند (Klotman and Chang, 2006).

پلی‌پپتیدهای ضد میکروبی عمدتاً غشای باکتری‌ها را هدف قرار می‌دهند (Hancock and Sahl, 2006) و با نفوذ به غشای سلولی و ایجاد منفذ در آن موجب دپلاریزاسیون غشا، نشت سیتوپلاسمی و کشندگی زیستی می‌شوند، عواملی مانند توالی اسیدهای آمینه، چند قطبی بودن، بار و شکل آن‌ها موجب می‌شود که این پلی‌پپتیدها به غشای دولایه‌ای سلول‌ها به ویژه باکتری‌ها چسبیده و وارد غشا شوند. پلی‌پپتیدهای ضد میکروبی می‌توانند پس از ورود به سیتوپلاسم ضمن مهار آنزیم‌ها و واکنش‌های درون سلولی به تولید ماکرومولکول‌ها آسیب وارد کنند و موجب تخریب باکتری‌ها شوند (Hancock and

بیماری‌های عفونی مانع عمده‌ای در فعالیت آبی‌پروری است و اغلب موجب خسارات قابل توجه اقتصادی می‌شود. ماهیان تحت تاثیر بسیاری از بیماری‌های عفونی با منشاهاى مختلف قرار می‌گیرند. شیوع هر یک از این بیماری‌ها تاثیرات شدید زیست‌محیطی و اقتصادی به همراه دارد (Parker, 2001). در حال حاضر با توجه به رشد آبی‌پروری در سراسر جهان و به تبع آن، گسترش انواع بیماری‌ها، اقدامات پیشگیرانه نقش مهمی را در مدیریت بهداشت و بیماری آبزیان ایفا می‌کند. در دهه‌های گذشته مطالعات زیادی در مورد بیماری‌های باکتریایی و انگلی ماهی جهت مدیریت این بیماری‌ها، صورت پذیرفته است (Falco et al., 2009). پپتیدهای ضد میکروبی (AMPs)^۱ به عنوان بخش مهمی از سیستم ایمنی ذاتی در بی‌مهرگان و مهره‌داران از جمله ماهی شناخته شده است (Mulero et al., 2008). تعداد زیادی از پلی‌پپتیدهای ضد میکروبی به وفور در بسیاری از بافت‌های ماهی یافت می‌شود که نشان دهنده اهمیت آن‌ها در ایمنی ماهیان است (Noga et al., 2010). این پلی‌پپتیدها، کوچک (۸۰-۱۲

مقاومت دارویی، کاربرد آنتی‌بیوتیک‌ها با محدودیت‌هایی مواجه شده است (Lau et al., 2003). در عین حال مقاومت‌های شدید دارویی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها نیز در آبزیان گزارش شده است (Pandey and Mishra, 2009).

کشت سلولی ابزاری مناسب برای مطالعه پدیده‌های سلولی در شرایط کنترل شده و به دور از پیچیدگی‌ها و متغیرهای درون‌تنی است (Leong et al., 1997) و به عنوان مدل زیستی در بسیاری از زمینه‌های مطالعاتی مورد استفاده قرار می‌گیرد (Masters, 2002). در مقایسه با رده‌های سلولی، سلول‌های اولیه دارای شکل ظاهری سلول‌های طبیعی هستند. این سلول‌ها که مستقیماً از بافت جدا می‌شوند، بسیاری از نشانگرهای مهم و عملکردهای موجود در بدن را حفظ می‌کنند و خواص عملکردی نزدیک به *in vivo* دارند (Alge et al., 2006; Pan et al., 2009). رده‌های سلولی در فرآیند تولید و نامیرا شدن دچار تغییرات ژنوتیپ و فنوتیپ در سلول می‌شوند. این تغییرات موجب کاهش شباهت سلول به بافت اصلی می‌شوند و می‌توانند نتایج مثبت یا منفی کاذب را ایجاد کنند به نحوی که در آزمایش‌های مهم، یافته‌های کلیدی باید در

Sahl, 2006; Mulero et al., 2008; Smith et al., 2010).

هیپسیدین یک پلی‌پپتید غنی از سیستمین است که ۲۰ الی ۲۵ اسید آمینه در طول خود دارد. تجزیه و تحلیل توالی هیپسیدین یافت شده در ماهیان نشان می‌دهد که این پلی‌پپتیدها ایزوفورم‌های متعددی دارند که حاوی ۴، ۶ و ۸ اسید آمینه سیستمین در توالی خود هستند که موجب ایجاد پیوندهای دی‌سولفیدی می‌شود (Wang et al., 2009).

یکی از مهم‌ترین گونه‌های پرورشی ماهی در ایران قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) است (Kalbassi et al., 2012). بیماری استرپتوکوکوزیس ناشی از *Streptococcus iniae* جزء مهم‌ترین بیماری‌های باکتریایی پرورش قزل‌آلای رنگین‌کمان در ایران است (اخلاقی و کشاورزی، ۱۳۸۱؛ پورغلام و همکاران، ۱۳۸۹؛ Soltani et al., 2005). این بیماری در بیش از ۴۰ گونه ماهی اعم از ماهیان پرورشی و وحشی، ماهیان آب شور و شیرین و نیز ماهیان زینتی گزارش شده است (Roach et al., 2006).

برای درمان استرپتوکوکوزیس از آنتی‌بیوتیک استفاده می‌شود. اما به دلیل

از انتقال به مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران، در آکواریوم‌های شیشه‌ای (۱۰ لیتر) با دمای ۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

آماده‌سازی و کاشت بافت

ماهیان توسط پودر گل میخک (۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر) بیهوش و با ضربه به جمجمه نخاعی شدند. سپس سطح بدن آن‌ها توسط محلول بافر فسفات سالین (PBS) حاوی آنتی‌بیوتیک (۱۰۰۰ واحد پنی‌سیلین تزریقی و ۱۰۰۰ میکرولیتر جنتامایسین) شستشو داده شد. باله دمی به وسیله قیچی جدا و به لوله آزمایش در بدار حاوی ۳۰ میلی‌لیتر محلول بافر فسفات سالین و آنتی‌بیوتیک منتقل شد و به مدت ۱۵ دقیقه بر روی شیکر قرار گرفت تا مخاط و بافت از هم جدا شوند سپس محلول رویی زیر هود تخلیه شد و محلول جدید بافر فسفات سالین حاوی آنتی‌بیوتیک جایگزین آن شد، این عمل شش بار تکرار شد تا مخاط‌ها از سطح باله پاک شود (Wolf and Quimby, 1969).

پس از اطمینان از عدم وجود مخاط، باله‌ها به زیر هود منتقل شدند و در پتری‌دیش‌های حاوی محیط کشت L-15 (Gibco, آمریکا) به قطعات $1-2\text{mm}^2$ تقسیم شدند. ۸ قطعه از باله‌ها در هر چاهک از ظرف کشت ۶ خانه‌ای

کشت‌های سلول‌های اولیه نیز تایید شوند (Kaur and Dufour, 2012).

با در نظر گرفتن اهمیت بیماری استرپتوکوکوزیس و ضررهای اقتصادی ناشی از آن به گونه پرسود ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان، بروز و پراکنش این بیماری در بسیاری از مراکز پرورش ماهی در استان‌های مختلف کشور، سهولت انتقال این بیماری در ماهیان و انتقال آن به انسان و با توجه به مطالعات صورت گرفته بر روی پلی‌پیتیدهای ضد میکروبی و توانایی آن‌ها در مهار بسیاری از باکتری‌های بیماری‌زا و همچنین کاربرد سلول‌های اولیه به عنوان مدل زیستی با خواص عملکردی نزدیک به شرایط *in vivo* در این بررسی کارایی پلی‌پیتید ضد میکروبی EC-hepcidin1 در مهار باکتری *S. iniae*، در کشت سلولی اولیه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

ماهی

۳۰ قطعه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) با وزن میانگین 200 ± 50 گرم از مرکز تحقیقات ماهیان سردآبی واقع در تنکابن تهیه شد. ماهیان پس

پلی پپتید ضد میکروبی EC-hepcidin1
 در این آزمایش از پلی پپتید EC-hepcidin نوع I که از ماهی *Epinephelus coioides* استخراج شده بود (Zhou et al., 2011) استفاده شد. این پلی پپتید با خلوص ۹۵ درصد و به روش شیمیایی تولید شد (Biomatik، آمریکا). توالی پلی پپتید EC-hepcidin1 (۲۴ اسید آمینه) دارای دو پیوند دی سولفید بین اسیدهای آمینه سیستئین خود است (C5-C22 و C9-C18؛ شکل ۱)



شکل ۱: پیوند ساختمانی و نمایش محل پیوندهای دی سولفید در پلی پپتید EC-hepcidin1

از محلول PBS برای تهیه سوسپانسیون پپتید EC-hepcidin1 استفاده شد.

تعیین سمیت پلی پپتید EC-hepcidin1 بر سلول اولیه ماهی

برای تعیین سمیت پلی پپتید EC-hepcidin1 از روش رنگ آمیزی با رد نوترال^۱ استفاده شد. تعداد ۱۵۰۰۰ سلول در هر یک از چاهک های میکروپلیت های ۹۶ چاهکی کشت

(TPP، سوئیس) گذاشته شد و بر روی بافت ها لامل قرار گرفت، ۱ میلی لیتر محیط کشت L-15 حاوی ۲۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS) (Invitrogen، آمریکا) و ۰/۵ درصد ترکیب پنی سیلین- استرپتومایسین (۱:۱) به هر چاهک ریخته شد و به انکوباتور ۲۰ درجه سانتی گراد منتقل شد. ظرف کشت به مدت یک هفته هر روز از نظر میزان مهاجرت سلول-ها از بافت باله و آلودگی مورد بررسی قرار گرفتند. زمانی که سلول ها ۷۰ درصد کف چاهک را پوشاندند، اولین پاساژ سلول ها انجام شد. برای جدا کردن سلول ها از کف، ۵۰۰ میکرولیتر آنزیم تریپسین (Trypsin-EDTA) ۰/۰۲ درصد (Invitrogen، آمریکا) به هر چاهک اضافه شد. بعد از سه دقیقه برای خنثی سازی این آنزیم، ۱ میلی لیتر محیط کشت حاوی FBS به چاهک ها اضافه شد و چندین بار عمل پیپتاژ انجام شد تا تمام سلول ها از کف جدا شوند و به مدت ۴ دقیقه (۱۲۰۰ rpm) سانتریفیوژ (BIO-RAD، آمریکا) شدند. پلیت سلول تشکیل شده در ۱ میلی لیتر محیط کشت به صورت سوسپانسیون درآمد و به فلاسک کشت منتقل شد (Wolf and Quimby, 1976).

موج ۵۴۰ نانومتر مورد سنجش قرار گرفت (Repetto et al., 2008).

باکتری *Streptococcus iniae*

استوک خالص باکتری *S. iniae* (سویه GQ 850377) از گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران تهیه شد که از تلفات ماهیان قزل‌آلای مزارع کشور جداسازی و شناسایی شده بود. تحت شرایط استریل باکتری به محیط مولر-هینتون برات (Merck، آلمان) اضافه شد. بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، میزان کدورت ایجاد شده در اثر رشد باکتری‌ها با استفاده از استاندارد نیم مک‌فارلند ($1/5 \times 10^8$ CFU/mL) تنظیم شد.

تعیین میزان حساسیت سلول‌های اولیه ماهی

به باکتری *Streptococcus iniae*

تعداد ۱۵۰,۰۰۰ سلول در هر چاهک پلیت‌های ۲۴ خانه‌ای کشت داده شد تا تمام سطح چاهک به صورت تک لایه پوشانده شد. باکتری در دو تراکم 10^1 MOI و 10^2 MOI به هر چاهک اضافه شد و در ۱۸ درجه سانتی‌گراد در دو تیمار ۲۴ و ۴۸ ساعت (سه تکرار) انکوبه شد. چاهک حاوی DMSO (۳۰

داده شدند و تک لایه کاملی از سلول‌ها به دست آمد. سپس محلول PBS به ویال حاوی پلی‌پتید EC-hepcidin1 اضافه شد تا سوسپانسیون آن به دست آید. پلی‌پتید در رقت‌های ۲۵ تا ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به روش شیب رقت به چاهک‌ها اضافه شد. دو چاهک نیز به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. چاهک حاوی دی‌متیل سولفوکسید (DMSO، ۱۰ درصد) به عنوان شاهد مثبت و چاهک فاقد هر گونه نمونه به عنوان شاهد منفی در نظر گرفته شد. برای هر غلظت سه تکرار در نظر گرفته شد. میکروپلیت‌ها به انکوباتور ۱۸ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. برای تعیین میزان سمیت پلی‌پتید بعد از ۲۴ و ۴۸ ساعت میزان زنده‌مانی سلول‌ها مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور چاهک‌ها تخلیه شدند و به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر از محلول نوترال رد (۴۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) اضافه شد و به مدت ۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شد. چاهک‌ها از رنگ تخلیه شدند و سلول‌ها دو بار توسط تثبیت کننده فرمالدئید شستشو داده شدند. سپس به هر یک از چاهک‌ها ۲۰۰ میکرولیتر بافر سیترات-الکل اضافه و برای مدت ۱۰ دقیقه بر روی شیکر قرار داده شد، سپس میزان جذب نوری چاهک‌ها را در طول

شد. در پلیت جداگانه ۴ آنتی‌بیوتیک نوروفلوکسازین (۱۰ میکروگرم در هر دیسک)، اریترومایسین (۱۵ میکروگرم در هر دیسک)، آموکسی سیلین (۲۵ میکروگرم در هر دیسک) و تتراساکلین (۳۰ میکروگرم در هر دیسک) به عنوان شاهد مثبت و دیسک آغشته به PBS به عنوان شاهد منفی در نظر گرفته شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه نگهداری شدند و پس از آن قطر هاله اطراف دیسک‌ها اندازه‌گیری شد. برای هر تیمار سه تکرار در نظر گرفته شد (Baner et al., 1991).

تعیین کمترین رقت مهارى رشد

آزمایش تعیین کمترین رقت مهارى رشد (MIC)^۱ در پلیت ۹۶ خانه استریل و با روش براث میکرودیلوژن انجام شد. ابتدا از محیط کشت مولر- هینتون براث ۱۰۰ میکرولیتر داخل هر چاهک میکروپلیت ریخته شد. سپس به اولین چاهک ۱۰۰ میکرولیتر از محلول پلی‌پتید اضافه شد. بعد از مخلوط کردن محتویات چاهک اول، ۱۰۰ میکرولیتر از آن برداشته و به چاهک بعدی اضافه شد. به همین ترتیب رقت‌های متوالی تا چهار رقت

درصد) به عنوان شاهد مثبت و چاهک فاقد هر گونه نمونه به عنوان شاهد منفی در نظر گرفته شد. سپس میزان زنده‌مانی سلول‌ها توسط روش رنگ‌آمیزی تریپان‌بلو سنجیده شد. به منظور اطمینان از آلوده نبودن سلول‌های مورد استفاده، قبل از تلقیح باکتری *S. iniae* ۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت سلول‌ها از هر چاهک بر محیط مولر- هینتون آگار روی پلیت کشت باکتری، کشت داده شد (Edwards and Massey, 2011).

اندازه‌گیری اثرات ضدباکتریایی پلی‌پتید

EC-hepcidin1 با روش چاهک دیفیوژن

برای بررسی حساسیت باکتری *S. iniae* به پلی‌پتید EC-hepcidin1 با روش چاهک دیفیوژن، ابتدا سوسپانسیون باکتری *S. iniae* معادل نیم مک‌فارلند تهیه شد. سپس باکتری به وسیله سوآپ در سطح پلیت حاوی محیط کشت مولر- هینتون آگار کشت متراکم داده شد. پلی‌پتید EC-hepcidin1 با استفاده از PBS به صورت سوسپانسیون در آمد و سه رقت ۰/۱، ۰/۰۱ و ۰/۰۰۱ از آن تهیه شد. ۱۰۰ میکرولیتر از رقت‌های تهیه شده به طور جداگانه و به صورت نقطه‌ای به سطح محیط کشت و با فاصله حداقل ۲ سانتی‌متر تلقیح

1- Minimum Inhibitory Concentration

محیطها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. کمترین غلظتی از پلی‌پپتید که باعث کشته شدن حداقل ۹۹ درصد باکتری‌ها شود، به عنوان MBC اعلام می‌شود (Ferraro, 2002).

اثر ضدباکتریایی پلی‌پپتید EC-hepcidin1 بر میزان زنده‌مانی سلول‌های آلوده به باکتری *Streptococcus iniae*

تعداد ۱۵۰,۰۰۰ سلول در هر چاهک پلیت‌های ۲۴ خانه کشت داده شد تا سطح چاهک به صورت تک لایه پوشانده شد. باکتری با تراکم $MOI:10$ به همراه ۱۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر پلی‌پپتید به محیط کشت سلول اضافه شد. نمونه‌ها در ۱۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. برای هر تیمار سه تکرار در نظر گرفته شد. چاهک حاوی DMSO (۳۰ درصد) به عنوان شاهد مثبت و چاهک فاقد هر گونه نمونه به عنوان شاهد منفی در نظر گرفته شد. میزان زنده‌مانی سلول‌ها به روش رنگ‌آمیزی تریپان بلو سنجیده شد (Edwards and Massey, 2011).

آنالیز آماری

تهیه شد و از چاهک چهارم ۱۰۰ میکرولیتر دور ریخته شد. سپس به هر چاهک از میکروپلیت ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون آماده باکتری *S. iniae* با تراکم CFU/mL $10^5 \times 1/5$ اضافه شد. محاسبات به گونه‌ای است که پس از اضافه شدن ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری *S. iniae* در چاهک اول پلی‌پپتید به غلظت ۳۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، چاهک دوم ۱۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، چاهک سوم ۷۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر و چاهک چهارم ۳۷/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر برسد. برای هر غلظت دو تکرار در نظر گرفته شد. میکروپلیت به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد و سپس مورد بررسی قرار گرفت. وجود کدورت در چاهک نشان دهنده رشد باکتری و شفافیت نشان‌دهنده عدم رشد باکتری است. کمترین رقتی که در آن هیچ کدورتی مشاهده نشد معادل MIC در نظر گرفته شد (Ferraro, 2002).

تعیین کمترین رقت باکتری‌کشی

برای تعیین کمترین رقت باکتری‌کشی (MBC)^۱ از همه چاهک‌های فاقد کدورت در محیط مولر-هینتون آگار کشت داده شد.

1- Minimum Bactericidal Concentration

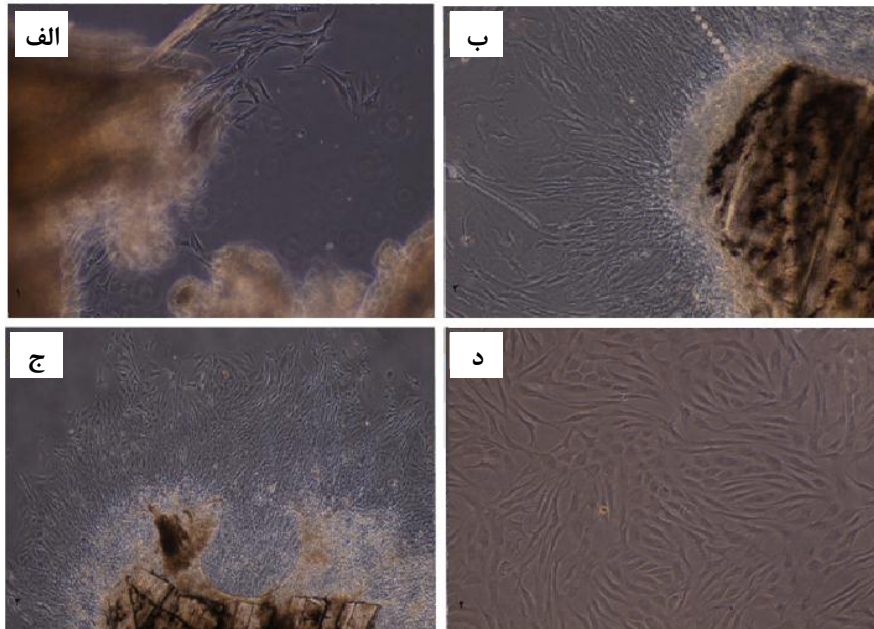
کاشت آغاز شد. در طی ۱۰ روز سلول‌ها به خوبی رشد کردند و بعد از ۱۴ روز تعداد سلول‌ها به اندازه‌ای رسید که اولین پاساژ صورت پذیرفت و به دنبال آن هر ۱۵-۱۰ روز پاساژ‌های متناوبی انجام شد. سلول‌های به دست آمده از نظر ریخت‌شناسی مخلوطی از سلول‌های اپیتلیالی و فیبروبلاستی شکل را نشان دادند (شکل ۲).

بررسی داده‌ها با استفاده از آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) و مقایسه میانگین‌ها با پس‌آزمون دانکن در سطح اطمینان ۹۵ درصد انجام شد.

نتایج

تولید سلول اولیه از ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان

اولین مهاجرت سلول‌ها از بافت باله ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان ۲۴-۳۶ ساعت پس از



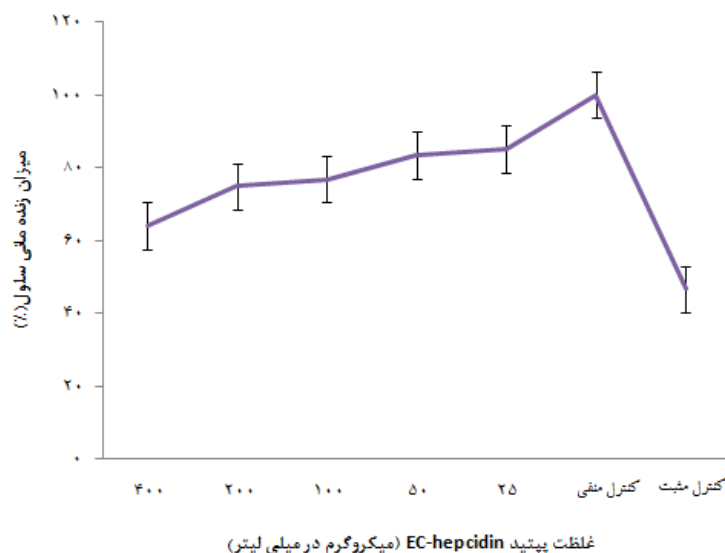
شکل ۲: مهاجرت سلول از بافت باله در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان. الف) مهاجرت سلول از بافت باله ۲۴ ساعت پس از کاشت بافت. ب) مهاجرت سلول از بافت باله ۳ روز پس از کاشت بافت. ج) مهاجرت سلول از بافت باله ۵ روز پس از کاشت بافت. د) سلول‌های اپیتلیالی و فیبروبلاستی شکل تولید شده از بافت باله در پاساژ ۱۰.

زنده‌مانی (۶۴ درصد) در غلظت ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و کمترین سمیت و بیشترین زنده‌مانی (۸۵ درصد) در غلظت ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد (شکل ۳).

آزمون چاهک دیفوژیون و قطر هاله عدم رشد نتایج آزمون چاهک دیفوژیون نشان داد که پلی‌پپتید EC-hepcidin دارای خواص ضدباکتریایی علیه باکتری *S. iniae* بود (شکل ۴).

تعیین میزان سمیت پلی‌پپتید EC-hepcidin1

برای تعیین میزان سمیت پلی‌پپتید نسبت به سلول‌ها، غلظت‌های مختلف پلی‌پپتید EC-hepcidin1 بر سلول‌های ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان مورد آزمون قرار گرفت که در طول ۲۴ ساعت سمیت را نشان ندادند، اما بعد از ۴۸ ساعت سمیت مشاهده شد و در غلظت‌های متفاوت، موجب مرگ سلول‌ها شد. به گونه‌ای که با افزایش غلظت پلی‌پپتید میزان زنده‌مانی سلول‌ها به طور معنی‌داری کاهش یافت ($P < 0/05$). بیشترین سمیت و کمترین



شکل ۳: میزان زنده‌مانی سلول‌های اولیه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در مواجهه با غلظت‌های مختلف

اثر EC-hepcidin1 پس از ۴۸ ساعت (میانگین \pm خطای استاندارد)



شکل ۴: آثار ضدباکتریایی رقت‌های ۰/۰۰۱، ۰/۰۱، ۰/۱ و پلی‌پپتید EC-hepcidin1 بر روی باکتری *Streptococcus iniae* در روش چاهک دیفیوژن

تعیین زنده‌مانی سلول در مواجهه با باکتری *Streptococcus iniae* و پلی‌پپتید EC-hepcidin1

نتایج آزمون تعیین حساسیت سلول به باکتری *S. iniae*، مرگ و میر سلول‌ها را در تراکم‌های متفاوت این باکتری نشان داد بعد از تلقیح باکتری در تراکم‌های MOI:۱۰۰ و MOI:۱۰ به سلول‌های ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان، میزان زنده‌مانی سلول‌ها به ترتیب ۲۲ و ۵۵ درصد بود که افزایش تراکم باکتری

با افزایش غلظت پلی‌پپتید، قطر عدم رشد باکتری افزایش یافت. بیشترین میزان هاله عدم رشد این پلی‌پپتید ۱۱ میلی‌متر بود. تغییرات میانگین هاله عدم رشد در باکتری *S. iniae* در رقت‌های مختلف پلی‌پپتید EC-hepcidin1 در جدول ۱ نشان داده شده است.

غلظت ۷۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر پلی-پپتید، موجب مهار رشد باکتری و غلظت ۱۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر آن منجر به کشته شدن باکتری شد (جدول ۲).

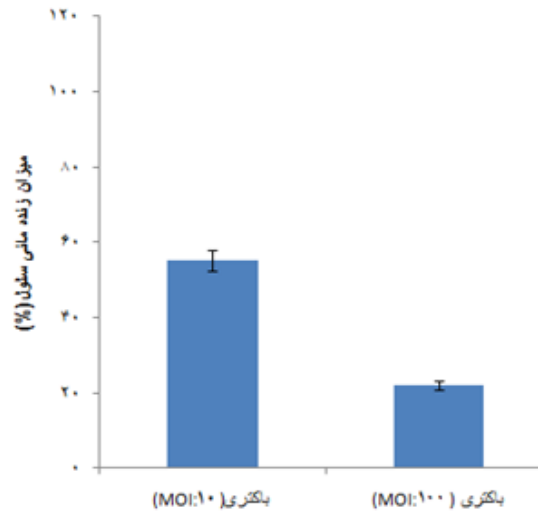
میزان زنده‌مانی سلول‌ها را به طور معنی‌داری کاهش داد ($P < 0/05$ ؛ شکل ۵). سلول‌های اولیه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان، پس از ۴۸ ساعت هیچ یک از سلول‌ها زنده نمانده بودند. تاثیر هم‌زمان تراکم $MOI: 10$ از باکتری *S. iniae* به همراه ۱۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر پلی‌پپتید EC-hepcidin1 بر سلول‌های اولیه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان، زنده‌مانی سلول‌ها را به طور معنی‌داری تا ۹۰ درصد افزایش داد ($P < 0/05$ ؛ شکل ۶).

جدول ۱: قطر هاله عدم رشد در باکتری *Streptococcus iniae* در اثر ترکیبات مختلف (میانگین \pm خطای استاندارد)

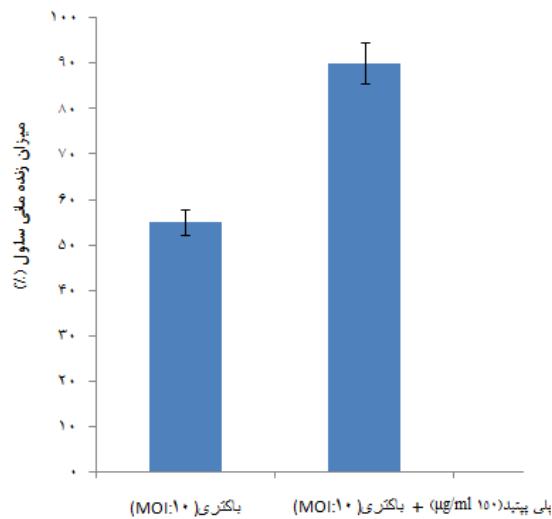
قطر هاله عدم رشد (میلی‌متر)	ترکیب
۱۱ \pm ۰/۴	پلی‌پپتید EC-hepcidin1 (۲۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر)
۸ \pm ۰/۸	پلی‌پپتید EC-hepcidin1 (رقیق ۰/۱)
۰	پلی‌پپتید EC-hepcidin1 (رقیق ۰/۰۱)
۰	پلی‌پپتید EC-hepcidin1 (رقیق ۰/۰۰۱)
۲۵ \pm ۰/۳	تتراساکلین
۲۰ \pm ۰/۹	اریترومایسین
۳۰ \pm ۱/۱	آموکسی‌سیلین
۲۵ \pm ۱/۰	نورفلوکسازین

جدول ۲: حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) غلظت‌های مختلف پلی‌پپتید EC-hepcidin1 در تراکم $1/5 \times 10^5$ (CFU/mL) باکتری *Streptococcus iniae*

MBC	MIC	غلظت پلی‌پپتید EC-hepcidin1 (میکروگرم بر میلی‌لیتر)
+	+	۳۰۰
+	+	۱۵۰
-	+	۷۵
-	-	۳۷/۵



شکل ۵: میزان زنده مانی سلول‌های اولیه ماهی قزل آلا رنگین کمان در مواجهه با تراکم‌های MOI:100 و MOI:10 باکتری *Streptococcus iniae* (میانگین \pm خطای استاندارد).



شکل ۶: میزان زنده مانی سلول‌های اولیه ماهی قزل آلا رنگین کمان در مواجهه با تراکم MOI:10 باکتری *Streptococcus iniae* و تراکم MOI:10 باکتری *Streptococcus iniae* به همراه EC-hepcidin1 (۱۵۰) میکروگرم بر میلی لیتر) پس از ۲۴ ساعت (میانگین \pm خطای استاندارد).

بحث

ماهیان شناسایی شده است که خواص متنوعی را از خود نشان می‌دهند (Xu et al., 2008). این ایزوفورم‌ها دارای فعالیت ضد میکروبی در برابر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی و قارچ‌ها هستند که در اکثر مطالعات این فعالیت در محدوده غلظت ۱-۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به دست آمده است (Shi and Camus, 2006; Masso-Silva and Diamond, 2014; Shirdel et al., 2019). تولید پلی‌پپتیدهای شیمیایی با الگو از پلی‌پپتیدهای تولید شده در بدن موجودات، به طور گسترده‌ای در حال انجام است و غالباً محصولات با خلوص بالا به دست می‌آید. مطالعات صورت گرفته بر روی این نوع پلی‌پپتیدها نتایج قابل ملاحظه‌ای در جلوگیری از رشد انواع عوامل بیماری‌زا نشان داده است. پژوهش‌های انجام شده بر روی پلی‌پپتیدهای هیپسیدین PC-hepc تولید شده از ماهی *(Pseudosciaena crocea)* و هیپسیدین تولید شده از ماهی دورگه باس مخطط *(Morone chrysops × Morone saxatilis)* نشان داد این پلی‌پپتیدها در غلظت‌های کم، دارای خواص ضد میکروبی بر روی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی،

مقاومت دارویی در باکتری‌ها در برابر آنتی‌بیوتیک‌های رایج باعث شده است تا داروهای جدیدی برای درمان عفونت‌های باکتریایی عرضه شود. در ۳۰ سال گذشته پلی‌پپتیدهای ضد میکروبی به عنوان آنتی‌بیوتیک‌های جدید برای مقابله با میکروب‌های مقاوم مطرح شده‌اند و انواع زیادی از آن‌ها تاکنون علاوه بر استخراج از طبیعت با روش شیمیایی تولید شده‌اند. پپتیدها، کاندیداهای خوبی برای دارو هستند، زیرا پیش‌ماده‌های طبیعی هستند که به تعدادی از آنزیم‌ها و گیرنده‌ها می‌چسبند. با این وجود به دلایل مختلف مثل هضم توسط پروتئازها، انتقال کم از غشا و انعطاف‌پذیری بالا، استفاده از آن‌ها به عنوان دارو دارای محدودیت است (Gnanakaran and Portman, 2003).

هیپسیدین دارای عملکرد دوگانه در بدن جانوران است، این پلی‌پپتید ملکولی کلیدی در حفظ هومئوستازی آهن و همچنین دارای فعالیت ضد میکروبی است (Falzacappa and Muckenthaler, 2005). ماهیان تلئوست دارای هیپسیدین بسیار متنوعی هستند که ممکن است مربوط به تنوع محیط‌های آبی باشد. ایزوفورم‌های مختلف هیپسیدین در انواع

ساده و سریع بودن عملیات کشت، عدم تماس با آنزیم و جلوگیری از آسیب به بافت و رصد مهاجرت سلول از بافت کاربرد وسیعی دارد (Avella et al., 1994). این روش اجازه می‌دهد تا هر دو نوع سلول اپیتلیالی و فیبروبلاستی از بافت مهاجرت کنند (Parameswaran et al., 2006). در مطالعات مختلف اکثریت سلول‌های تولید شده از بافت باله به روش Explant، ناهمگن بودند و مخلوطی از سلول‌های اپیتلیالی و فیبروبلاستی را نشان دادند (et al., 2018). در مطالعه نوروزی و همکاران (Bhardwaj, ۱۳۹۳) ریخت‌شناسی سلول‌های تولید شده از باله ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo trutta caspius*) با استفاده از این روش، مخلوطی از سلول‌های فیبروبلاستی- اپیتلیالی شکل بودند. ریخت‌شناسی سلول‌های به دست آمده در پژوهش حاضر نیز مخلوطی از سلول‌های فیبروبلاستی- اپیتلیالی شکل را نشان داد و این سلول‌ها از پاساژپذیری و زنده‌مانی مناسبی برخوردار بودند.

مانع اصلی در استفاده از پلی‌پپتیدهای ضد میکروبی به عنوان آنتی‌بیوتیک، سمیت و توانایی آن‌ها در لیز سلول‌های یوکاریوتی است. برای به کار بردن آن‌ها به عنوان عوامل دارویی،

مخمر و قارچ بودند (Lauth et al., 2005; Wang et al., 2009).

در مطالعاتی بر روی پلی‌پپتیدهای EC-hepcidin1 و hepcidin2 نشان داده شد که این پلی‌پپتیدها در برابر باکتری گرم مثبت *Staphylococcus aureus* و باکتری گرم منفی *Vibrio vulnificus* دارای خواص ضدباکتریایی بود و غلظت بیش از ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر آن از رشد باکتری‌ها جلوگیری کرد (Zhou et al., 2011). در پژوهش حاضر نیز خواص ضد میکروبی پلی-پپتید EC-hepcidin1 بر روی باکتری *S. iniae* مورد آزمون قرار گرفت که نشان داد هیپسیدین تولید شده قادر است تا از رشد و تکثیر این باکتری جلوگیری کند که مشابه نتایج سایر مطالعات بود.

کشت‌های سلولی ابزاری مناسب برای مطالعات میکروبی، ژنتیک ملکولی، زیست‌شناسی تکوینی، سم‌شناسی و بررسی تاثیر داروها است (Leong et al., 1997). در رده‌های سلولی تولید شده از ماهیان، بیشترین رده‌های سلولی بعد از گناد، از باله تولید شده است که به علت قدرت ترمیم بالای این بافت بوده است (Fryer and Lannan, 1994). در مطالعات تولید سلول، روش Explant به علت

در مطالعه بر روی تاثیر خواص ضدباکتریایی این پلی‌پپتید در محیط *in vitro* و بر روی میزان زنده‌مانی سلول‌های آلوده شده به باکتری نشان داد پلی‌پپتید EC-hepcidin1 قادر به کشتن باکتری *S. iniae* بود و میزان زنده‌مانی سلول‌های آلوده شده را تا بیش از ۹۰ درصد افزایش داد.

در مجموع با توجه به نتایج به دست آمده از این مطالعه، می‌توان بیان کرد که پلی‌پپتید EC-hepcidin1 اثرات ضدباکتریایی مناسبی را بر روی باکتری *Streptococcus iniae* در شرایط آزمایشگاهی (*in vitro*) داشت و در عین حال سمیت کمی را نسبت به سلول‌های ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان نشان داد و توانست میزان زنده‌مانی سلول‌های آلوده شده با این باکتری را افزایش دهد. از این رو، پیشنهاد می‌شود که به عنوان یک جایگزین آنتی‌بیوتیکی مطالعات وسیع‌تر و دامنه‌دارتری در شرایط بالینی (*in vivo*) بر روی مراحل لاروی (به صورت غوطه‌وری) و یا در ماهیان مولد قزل‌آلای رنگین‌کمان (به صورت تزریقی) صورت گیرد.

باید در عین داشتن فعالیت ضد میکروبی بالا، سمیت کم نسبت به سلول‌های بدن و فعالیت همولیزی پایین داشته باشند (Chou et al., 2008). از سلول‌ها و رده‌های سلولی به صورت گسترده در تعیین میزان سمیت پلی‌پپتیدهای ضد میکروبی و اثر بخشی آن‌ها استفاده شده است (Bruijn et al., 2012). مدت زمان لازم برای تعیین سمیت مواد در مواجهه با سلول‌ها بین ۲۴ تا ۷۲ ساعت است (Bols et al., 2005) پلی‌پپتیدهای مختلف میزان سمیت متفاوتی را در برابر سلول‌ها نشان می‌دهند. در این پژوهش سلول‌های باله به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت تحت تاثیر پلی‌پپتید تولید شده EC-hepcidin1 قرار گرفت که بر اساس آن، در طی ۲۴ ساعت این پپتید هیچ گونه سمیتی بر روی سلول‌های اولیه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان نداشت، اما بعد از ۴۸ ساعت در غلظت‌های بالای پلی‌پپتید سمیت داشت و موجب مرگ کمتر از نیمی از سلول‌ها شد که نشان دهنده سمیت پایین این پلی‌پپتید برای سلول‌های ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان است.

منابع

- های خونی بچه ماهیان قزل آلا ی رنگین کمان. مجله علمی شیلات ایران، ۱۹(۲): ۹-۱۸.
- نوروزی ک.، کلباسی م.، فرزانه پ.، شاهزاده فاضلی ا.، فرقدان م.، نسیمیان ا.، آشوری س.، محمدی ش.، مرادمند ز. و فرهنگ نیا م. ۱۳۹۳. تولید و ارزیابی رده سلولی اپیتلیالی شکل از بافت باله ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo trutta caspius*). مجله فیزیولوژی و بیوتکنولوژی آبزیان، ۲(۳): ۶۹-۸۵.
- Alge C., Hauck S., Priglinger S., Kampik A. and Ueffing M. 2006.** Differential protein profiling of primary versus immortalized human RPE cells identifies expression patterns associated with cytoskeletal remodeling and cell survival. *Journal Proteome Review*, 5(4): 862-878.
- Avella M., Berhaut J. and Payan P. 1994.** Primary culture of gill epithelial cells from the sea bass *Dicentrarchus labrax*. In *Vitro Cellular and Developmental Biology*, 30: 41-49.
- Baner A.W., Kirby W.M.M., Sherries J.C., Truck M. 1991.** Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. *American Journal of Clinical Pathology*, 45: 493-496.
- Bols N.C., Dayeh V.R., Lee L.E.J. and Schirmer K. 2005.** Use of fish cell lines in the toxicology and ecotoxicology of fish. *Piscine cell lines in environmental toxicology*. P: 43-84. In: Mommsen P. and Moon T.W. (Eds.). *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*. Elsevier, Netherlands.
- Brogden K.A., Ackermann M., McCray P.B. and Tack B.F. 2003.** Antimicrobial peptides in animals and their role in host defenses. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 22: 465-478.
- Bhardwaj N., Goswami M. and Dwivedi K. 2018.** Development of cell culture system from selected of *Pangaius hypophthalmus*. *Pharmaceutical Science*, 5(4): 3203-3208.
- Bruijn I., Belmonte R., Anderson V., Saraiva M., Wang T., Van West P. and Secombes C. 2012.** Immune gene expression in trout
- اخلاقی م. و کشاورزی م. ۱۳۸۱. وقوع استرپتوکوکوزیس در مزارع پرورش قزل آلا ی استان فارس. مجله تحقیقات دامپزشکی ایران، ۳(۲): ۱۹۰-۱۸۳.
- پورغلام ر.، مکرمی رستمی ع.، سعیدی ع.، شریف پور ع.، غرقی ا. و پورغلام ح. ۱۳۸۹. بررسی اثرات حاد باکتری استرپتوکوکوس فسیوم (*Streptococcus faecium*) روی بعضی از بافتها و مشخصه

- cell lines infected with the fish pathogenic oomycete *Saprolegnia parasitic*. *Developmental and Comparative Immunology*, 38: 44–54.
- Chou H.T., Kuo T.Y., Chiang J.C., Pei M.J., Yang W.T. and Yu H.C. 2008.** Design and synthesis of cationic antimicrobial peptides with improved activity and selectivity against *Vibrio* spp. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 32: 130–138
- Edwards A. and Massey R. 2011.** Invasion of human cells by a bacterial pathogen. *Journal of Visualized Experiments*, 49: 1–4 (e2693).
- Falco A., Ortega-Villaizan M., Chico V., Brocal I., Perez L., Coll J.M. and Estepa A. 2009.** Antimicrobial peptides as model molecules for the development of novel antiviral agents in aquaculture. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 9: 1159–1164.
- Falzacappa V. and Muckenthaler M.U. 2005.** Hecidin: Iron-hormone and anti-microbial peptide. *Gene*, 364: 37–44.
- Fryer J.L. and Lannan C.N. 1994.** Three decades of fish cell culture: A current listing of cell lines derived from fishes. *Journal of Tissue Culture Methods*, 16(2): 87–94.
- Gnanakaran H. and Portman J. 2003.** Peptide folding simulations. *Current Opinion in Structural Biology*, 13: 168–174.
- Hancock R.E. and Sahl H.G. 2006.** Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nature Biotechnology*, 24(12): 1551–1557.
- Kalbassi M.R., Abdollahzadeh E. and Salari-Joo H. 2012.** A review on aquaculture development in Iran. *Journal of Ecopersia*. 1(2): 159–178.
- Kaur G. and Dufour J. 2012.** Cell lines valuable tools or useless artifacts. *Spermatogenesis*, 2(1): 1–5.
- Klotman M.E. and Chang T.L. 2006.** Defensing in innate antiviral immunity. *Nature Reviews Immunology*, 6: 447–56.
- Lau S.K.P., Woo P.C.Y., Tse H., Leung K.W., Wong S.S.Y. and Yuen K.Y. 2003.** Invasive *Streptococcus iniae* infections outside North America. *Journal of Clinical Microbiology*, 41: 1004–1009.
- Lauth X., Babon J.J., Stannard J.A., Singh S., Nizet V. and Carlberg J.M. 2005.** Bass hecicin synthesis, solution structure, antimicrobial activities and synergism, and in vivo hepatic response to bacterial infections.

- Journal of Biological Chemistry, 280: 9272–9282.
- Leong J.C., Anderson E., Bootland L.M., Chiou P.W., Johnson M., Kim C., Mourich D. and Trobridge G. 1997.** Fish vaccine antigens produced or delivered by recombinant DNA technologies. *Developments in Biological Standardization*, 90: 267–277.
- Masso-Silva J.A. and Diamond G. 2014.** Antimicrobial peptides from fish. *Pharmaceuticals*, 7: 265–310.
- Masters J.R. 2002.** HeLa cells 50 years on: The good, the bad and the ugly. *Nature Review Cancer*, 2: 315–319.
- Mulero I., Noga E.J., Meseguer J., Garcia-Ayala A. and Mulero V. 2008.** The antimicrobial peptides piscidins are stored in the granules of professional phagocytic granulocytes of fish and are delivered to the bacteria-containing phagosome upon phagocytosis. *Developmental and Comparative Immunology*, 32: 1531–1538.
- Ferraro M.J. 2002.** Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, M100. *Clinical and Laboratory Standards Institute*. 240P.
- Noga E.J., Ullal A.J., Corrales J. and Fernandes J.M. 2010.** Application of antimicrobial polypeptide host defenses to aquaculture: Exploitation of down regulation and up regulation responses. *Comparative Biochemistry and Physiology D*, 6(1):44–54.
- Pan C., Kumar C., Bohl S., Klingmueller U. and Mann M. 2009.** Comparative proteomic phenotyping of cell lines and primary cells to assess preservation of cell type-specific functions. *Molecular Cell Proteomics*, 8(3): 443–450.
- Pandey R. and Mishra A. 2009.** Antibacterial activities of crude extract of *Aloe barbadensis* to clinically isolated bacterial pathogens. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 3(1): 1–6.
- Parker H.S. 2001.** Aquaculture research is key to the future of U.S. fish farming. *Agriculture Research*, 49: 20–32.
- Parameswaran V., Shukla R., Bhonde R.R. and Sahul Hameed A.S. 2006.** Splenic cell line from sea bass, *Lates calcarifer*: Establishment and characterization. *Aquaculture*, 261: 43–53.
- Repetto G., Peso A. and Zurita J. 2008.** Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nature Protocols*, 3: 71125–71131.
- Roach J.C.M., Levett P.N. and Lavoie M.C. 2006.** Identification of *Streptococcus iniae* by commercial bacterial identification systems. *Journal of*

- Microbiological Methods, 67: 20–32.
- Shi J. and Camus A.C. 2006.** Hecidins in amphibians and fishes: Antimicrobial peptides or iron-regulatory hormones? *Developmental and Comparative Immunology*, 30: 746–755.
- Shirdel I., Kalbassi M.R., Hosseinkhani S., Paknejad H. and Wink M. 2019.** Cloning, characterization and tissue-specific expression of the antimicrobial peptide hepcidin from Caspian trout (*Salmo caspius*) and the antibacterial activity of the synthetic peptide. *Fish and Shellfish Immunology*, 90: 288–296.
- Smith V.J., Desbois A.P. and Dyrnya E.A. 2010.** Conventional and unconventional antimicrobials from fish, marine invertebrates and micro-algae. *Marine Drugs*, 8: 1213–1262.
- Soltani M., Jamshidi S. and Sharifpour I. 2005.** Streptococcosis caused by *Streptococcus iniae* in farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Iran: Biochemical characteristics and pathogenesis. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 25: 95–106.
- Wang K.J., Cai J.J., Cai L., Qu H.D., Yang M. and Zhang M. 2009.** Cloning and expression of a hepcidin gene from a marine fish (*Pseudosciaena crocea*) and the antimicrobial activity of its synthetic peptide. *Peptides*, 30: 63–46.
- Wolf K. and Quimby M.C. 1969.** Fish cell and tissue culture. P: 253–305. In: Hoar W.S. and Randall D.J. (Eds.). *Fish Physiology*. Academic Press, USA.
- Wolf K. and Quimby M.C. 1976.** Primary monolayer culture of fish cells initiated from minced tissues. *Tissue Culture Association Manual*, 2(4): 445–448.
- Xu Q., Cheng C.H., Hu P., Ye H., Chen Z. and Cao L. 2008.** Adaptive evolution of hepcidin genes in Antarctic notothenioid fishes. *Molecular Biology and Evolution*, 25: 1099–112.
- Zhou G.J., Wei G., Xu D., Cui H., Yan Y. and Qin Q. 2011.** Molecular cloning and characterization of two novel hepcidins from orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*. *Fish and Shellfish Immunology*, 30: 559–568.



Research Paper

Effect of antimicrobial peptide EC-hepcidin1 on inhibition of *Streptococcus iniae* in primary cell culture of (*Oncorhynchus mykiss*)

Zohreh Ghodsi¹, Mohammad Reza Kalbassi^{2*}, Ashraf Mohebbati Mobarez³,
Parvaneh Farzaneh⁴

Received: January 2019

Accepted: June 2019

Abstract

Streptococcosis is the most destructive disease in world aquaculture, and many efforts have been made to curb these bacteria. In this study, the ability of artificial polypeptide hepcidin (EC-hepcidin1) was evaluated to control infection caused by *Streptococcus iniae* in primary cell culture of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Antibacterial effects of this polypeptide were examined by disk diffusion and minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration of EC-hepcidin1 were measured against *Streptococcus iniae*. The primary cells were produced from fish fin, and the toxicity range of the peptide was determined for the cells. The primary cells of the rainbow trout were infected with *Streptococcus iniae* and antimicrobial activity of EC-hepcidin1, as well as viability of the cells, were evaluated. Results showed the MIC and MBC were 75 and 150 µg/mL, respectively. The level of peptide toxicity on fish cells show that EC-hepcidin1 had low toxicity after 48h in the range of 25 to 400 µg/mL, and the cells had a viability of 60% to 80%. The viability of the cells was 55% after induction of the bacteria (10: MOI), and the survival rate of cells was increased up to 90% after induction of bacteria (10: MOI) with 150 µg/mL peptide. In conclusion, the EC-hepcidin1 has shown an antibacterial effect on *Streptococcus iniae* (in vitro) and the peptide has low toxicity to fish cells. It has increased the vitality of cells infected with *Streptococcus iniae*. Therefore, complementary clinical research on larval stage, as well as broodstock of rainbow trout, could be suggested in the future. In conclusion, the EC-hepcidin1 has been shown an antibacterial effect on *Streptococcus* and low toxicity to fish cells. It has increased the vitality of cells infected with *Streptococcus*. Therefore, complementary clinical research on larval stage and broodstock of fish could be suggested.

Key words: *Rainbow Trout Primary Cells, Antimicrobial Peptide, EC-hepcidin1, Streptococcus iniae.*

1- Ph.D. Student in Fisheries, Faculty of Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Noor, Iran.

2- Professor in Department of Aquaculture, Faculty of Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Noor, Iran.

3- Professor in Department of Bacteriology, Faculty of Medical Sciences Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

4- Assistant Professor in Iranian Biological Resource Center, Tehran, Iran.

*Corresponding Author: kalbassi_m@modares.ac.ir

